DOI:10.16016/j.1000-5404.202106157

肿瘤微环境中 M2 巨噬细胞调控 CLDN10 通路促进膀胱癌细胞的上皮-间质转化

袁刚军[1],韩 娜[2],谭星亮[3],邹园涛[3],鲜 鹏[1],宋彦平[1],袁 方[1],戴君勇[1],唐显力[1],李 俊[1],王 呈[1],李 元[1],刘 南[1] 400030 重庆,重庆大学附属肿瘤医院:泌尿外科[1],健康体检与肿瘤筛查中心[2];150086 广州,中山大学肿瘤防治中心泌尿外科[3]

[摘要] **目的** 探讨膀胱癌微环境中 M2 巨噬细胞通过 CLDN10 信号通路对膀胱癌细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)的调控作用及其机制。**方法** 收集 2020 年 3-9 月重庆大学附属肿瘤医院收治的 10 例膀胱癌患者的新鲜癌组织及癌旁组织标本,免疫组化观测巨噬细胞表面标志物在膀胱癌组织中的表达;对癌和癌旁组织进行转录组测序,筛选出受巨噬细胞调控的潜在基因。采用 CCK-8、细胞克隆、Western blot 等方法观测 CLDN10 对膀胱癌细胞生长和增殖的作用。**结果** 巨噬细胞特征性分子 CD68 和 M2 型巨噬细胞 CD163 分子在膀胱癌组织中表达增加。对基因测序结果分析后发现 CLDN10 基因在膀胱癌组织中表达最显著,对膀胱癌组织免疫组化结果行免疫评分后发现 CLDN10 的表达与巨噬细胞在膀胱癌组织中的浸润呈正相关。Western blot 检测结果表明膀胱癌组织中 CLDN10 蛋白的表达水平较癌旁组织高($P<0.05$)。敲低 CLDN10 的表达后,与对照组相比,生长曲线结果表明膀胱癌细胞生长能力下降,细胞克隆形成实验结果表明膀胱癌细胞形成细胞克隆数目降低(198.0±10.3 *vs* 145.0±8.4,$P<0.05$),Western blot 检测结果表明 EMT 相关指标蛋白 snail、twist、vimentin 的表达水平降低,而 E-cadherin 的表达水平升高($P<0.05$)。**结论** 巨噬细胞上调膀胱癌细胞 CLDN10 的表达促进膀胱癌细胞 EMT 的发生。

[关键词] 巨噬细胞;肿瘤微环境;CLDN10;膀胱癌
[中图法分类号] R394.2; R730.23; R737.14 [文献标志码] A

M2 macrophages promotes bladder cancer EMT through CLDN10 involved signaling pathway in tumor micro-environment

YUAN Gangjun[1], HAN Na[2], TAN Xingliang[3], ZOU Yuantao[3], XIAN Peng[1], SONG Yanping[1], YUAN Fang[1], DAI Junyong[1], TANG Xianli[1], LI Jun[1], WANG Cheng[1], LI Yuan[1], LIU Nan[1] [1]Department of Urology, [2]Center for Health Examination and Cancer Risk Screening, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing, 400030; [3]Department of Urology, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong Province, 150086, China

[**Abstract**] Objective To investigate the role and mechanism on how M2 macrophages promote epithelial-mesenchymal transition (EMT) of bladder cancer cells *via* clauding10 (CLDN10)-mediated signaling pathway. Methods Ten pairs of fresh bladder cancer tissues and corresponding para-tumor tissues were collected in Chongqing University Cancer Hospital during March and September 2020. Immunohistochemical (IHC) assay was used to detect the expression of macrophages' membrane markers. The genes regulated by macrophages were screen out with transcriptome sequencing together with immune scores based on IHC assay in bladder tissues. CCK-8 assay, cellular colony and Western blotting were employed to observe the effect of CLDN10 on the growth and proliferation of bladder cancer cells. Results Macrophages' characteristic marker CD68 and M2 macrophages' CD163 were highly expressed in bladder cancer tissues. Gene sequencing indicated that CLDN10 was significantly expressed in the tumor tissues, and its expression was positively correlated with the infiltration of macrophages in bladder tissues. The results of Western blotting showed that the CLDN10 expression were higher in cancer tissues compared to adjacent normal tissues ($P<0.05$). Knockdown of CLDN10 decreased the growth ability of T24 cells and decreased the number of colonies than the untreated cells (198.0±10.3 *vs* 145.0±8.4, $P<0.05$). Additionally, the protein levels of snail, twist and vimentin were significantly decreased, whereas that of Ecadherin was increased after

[通信作者] 刘 南,E-mail: 1054567372@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

CLDN10 knockdown. **Conclusion** Macrophages upregulate CLDN10 expression in bladder cancer cells, and thus promotes EMT and progression of the cancer cells.

[**Key words**] macrophage; tumor microenvironment; CLDN10; bladder cancer

Corresponding author: LIU Nan, E-mail: 1054567372@qq.com

肿瘤微环境(tumor micro-environment,TME)是指肿瘤细胞所在的内外环境,包括肿瘤所在组织的结构、功能和代谢,与肿瘤的发生、生长及转移密切相关[1]。肿瘤微环境中浸润的各种免疫细胞和细胞因子构成了肿瘤的免疫微环境,主要包括巨噬细胞、$CD4^+$T 细胞、$CD8^+$T 细胞、树突状细胞、中性粒细胞、Treg 细胞等。这些细胞具有促癌和抑癌的双重调节作用,而这种调节作用主要取决于免疫细胞的功能状态和类别[2-3]。如何提高 TME 中免疫浸润细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤作用,是近年来肿瘤研究领域的前沿热点之一。例如,免疫检查点抑制剂 PD-1/PD-L1 单克隆抗体通过增强 $CD8^+$T 细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤作用,获得了显著的临床疗效[4]。近年来,随着对肿瘤微环境中免疫细胞的研究越来越深入,人们意识到免疫细胞的调控功能越来越重要和复杂[5-6]。

膀胱癌是中国人群泌尿系统发病率较高的恶性肿瘤之一,根据 2016 年 CHEN 等[7]发布的 2015 中国癌症发病情况,膀胱癌的发生率和死亡率正逐年升高。特别是晚期膀胱癌患者,传统放、化疗治疗效果较差,而以 PD-1/PD-L1 单抗为代表的新型免疫治疗的问世无疑给晚期膀胱癌患者带来了新的希望[8]。尽管如此,目前的免疫治疗方案仍面临有效率不高、疗效不确切等诸多问题。要解决这些问题,首先要深入研究膀胱癌瘤微环境中免疫细胞的种类分布及其调控肿瘤发生发展的机制。因此,本研究探讨膀胱癌微环境中免疫细胞的分布情况,发现巨噬细胞在膀胱癌组织中浸润数量明显增多;进一步采用内部测序数据筛选出受巨噬细胞调控的潜在靶基因,并用外部测序数据进行了验证,发现巨噬细胞可能通过 CLDN10 基因介导的信号通路对膀胱癌细胞进行调控。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2020 年 3-9 月重庆大学附属肿瘤医院行根治性膀胱全切的 10 例膀胱癌患者癌组织和癌旁组织新鲜标本,保存于福尔马林标本保存液或液氮中,分别用于免疫组化实验和 Western blot 实验。其中,男性 8 例,女性 2 例;年龄 47~72 岁,平均 61.8 岁。根据 2010AJCC TNM 分期,T1 期 1 例,T2 期 8 例,T3 期 1 例;所有癌组织标本经病理诊断为尿路上皮癌。本研究经重庆大学附属肿瘤医院伦理委员会批准(2021 年 2 月)。

1.2 膀胱癌细胞系

膀胱癌 T24 细胞株来源于中山大学肿瘤防治中心实验研究部的基础实验室。细胞在含 10%小牛血清、100 IU/mL 青/链霉素的 RPMI1640 的培养基中培养,培养环境为:37 ℃、5% CO_2 的湿化培养箱中。

1.3 免疫组化检测

将福尔马林液固定过的膀胱癌组织标本用石蜡包埋后切片,经过脱蜡、抗原修复、抗体孵育、DAB 染色、封片等过程后,在显微镜下观察染色情况。对样本进行转录组测序,筛选癌组织和癌旁组织差异表达基因;依据膀胱癌组织中巨噬细胞的表达强弱进行免疫评分,分为高低浸润组,采用软件分析技术筛选出两组间的差异表达基因。

1.4 Western blot 检测

将液氮中保存的膀胱癌组织标本在液氮环境下研磨后加入 RIPA 细胞裂解液,并离心后分离提取出蛋白上清液。然后通过配制 SDS 电泳凝胶、转膜、抗体孵育等步骤后,用 CLDN10、Snail、Twist、E-cadherin、β-actin、GAPDH 等抗体检测相应蛋白的表达。

1.5 TCGA 数据库分析

分析 TCGA 数据库中膀胱癌的生存数据和目的基因的预后相关性。

1.6 慢病毒转染实验

为构建稳定敲低表达 CLDN10 的膀胱癌细胞株,将含 sh-CLDN10 的慢病毒质粒(Lipofectamine3000,Invotrigen,美国)感染 293-T 细胞,72 h 后收集病毒液。然后将病毒液感染膀胱癌 T24 细胞,48 h 后在显微镜下观察荧光蛋白的表达情况。确认转染成功后将 T24 细胞用胰酶消化,分装冻存。将敲低表达 CLDN10 膀胱癌 T24 细胞作为敲低 CLDN10 组,以未转染的膀胱癌 T24 细胞作为对照组。

1.7 CCK-8 检测

用 CCK-8(cell counting kit-8)试剂(日本 Dojindo 公司)检测细胞生长情况。96 孔板培养细胞,待细胞长到 80%~90%时,按预先设计的时间点测定细胞的生长值,在时间点之前 30~120 min 每孔加入 20 μL CCK-8 试剂(100 μL 培养基加入 10 μL 试剂),继续培养。采用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔光密度值,然后根据所测值计算并绘制生长曲线。

1.8 细胞克隆实验

接种细胞到 6 孔板,每孔接种约 500 个细胞,培养 5~7 d 后肉眼可见克隆时,甲醇固定 30 min、结晶紫液染色 30 min 后,在镜下观察细胞克隆数。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件包分析和处理数据,每组实验独立重复 3 次,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用两独立样本 t 检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　免疫组化检测膀胱癌组织中免疫细胞的浸润情况

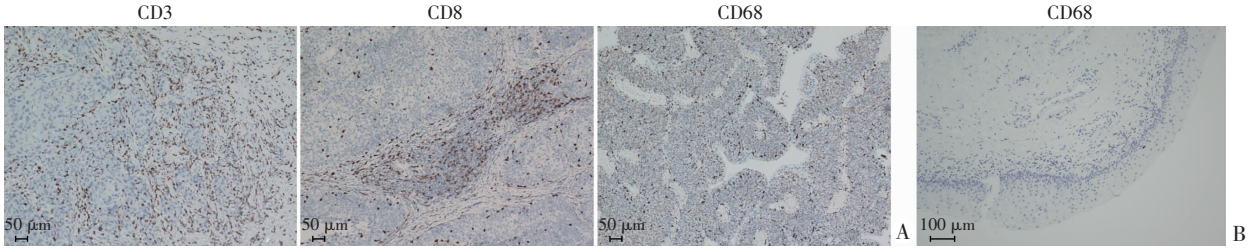
免疫组化结果表明,除 CD3、CD8 外,巨噬细胞表面特征性 CD68 分子在癌细胞周围的间质中染色呈强阳性,而 CD68 在癌旁正常组织中的染色呈阴性(图 1)。

2.2　免疫组化检测膀胱癌组织中巨噬细胞的浸润情况

免疫组化结果表明,M2 巨噬细胞表面特征性分子 CD163 在膀胱癌组织中表达呈强阳性,而 M1 巨噬细胞表面特征性分子 iNOS 则表达阴性(图 2A);iNOS 和 CD163 分子在癌旁正常组织表达阴性(图 2B)。

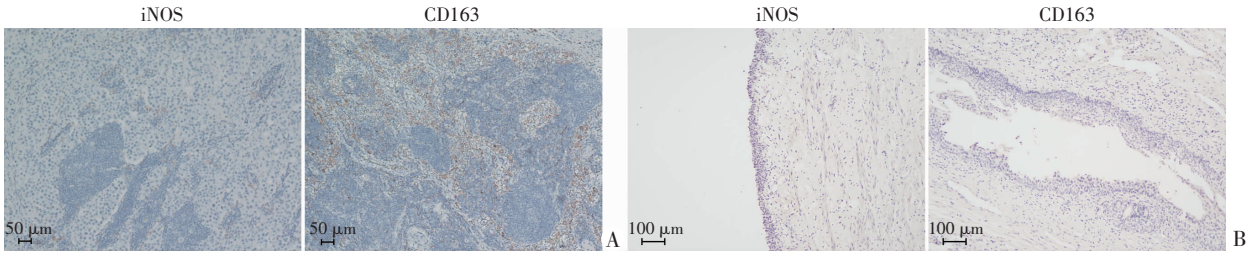
2.3　膀胱癌及癌旁组织全转录组测序结果

对 10 对膀胱癌及对应癌旁组织进行转录组测序,结果表明,癌组织和癌旁组织间有 4 640 个差异表达基因(Fold change >2,FDR <0.05,图 3A)。采用软件分析筛选出膀胱癌组织中巨噬细胞浸润高低两组间的差异表达基因(图 3B)。将 A、B 两组基因进行交叉性分析,筛选出两者间共同调控的表达基因,其中 CLDN10 基因表达明显升高,最为显著(图 3C)。



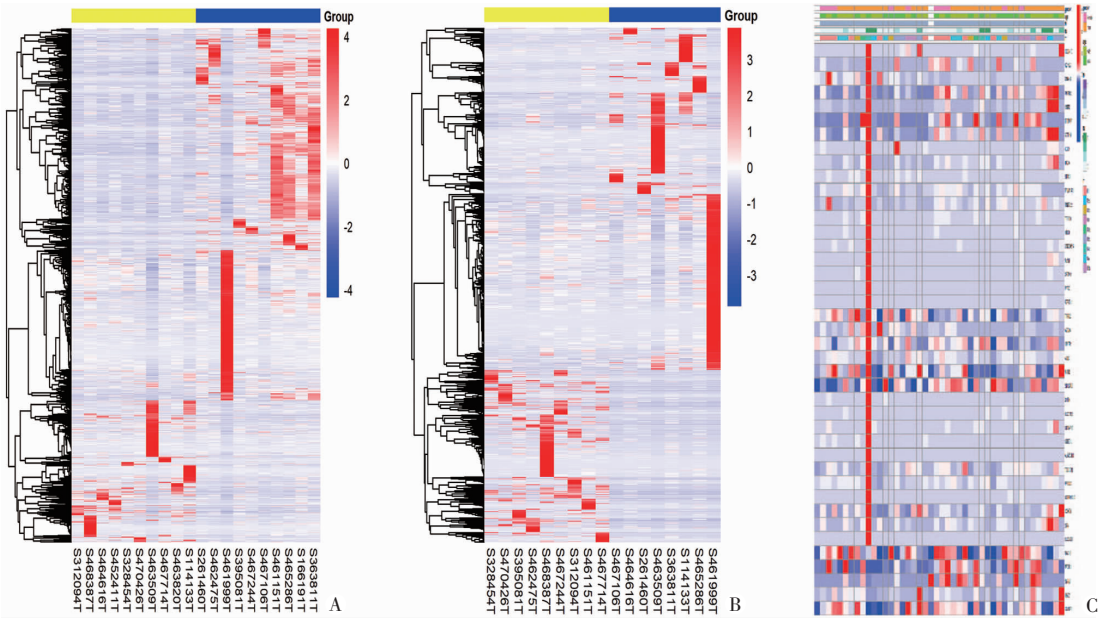
A:膀胱癌组织;B:癌旁组织

图 1　膀胱癌组织及癌旁组织中免疫细胞表面特征性分子的表达



A:膀胱癌组织;B:癌旁组织

图 2　巨噬细胞表面特征性分子在膀胱癌组织的表达



A:癌组织和癌旁组织间的基因表达差异;B:巨噬细胞浸润评分高低两组间的基因表达差异;C:软件分析筛选出 A、B 两组间的共同差异表达基因

图 3　两组间基因表达差异热图

2.4　免疫组化检测 CLDN10 在膀胱癌组织的表达部位

为明确 CLDN10 在膀胱癌组织的表达部位,选取膀胱癌组织石蜡切片进行 IHC 实验,结果显示,CLDN10 表达于膀胱癌细胞的胞质和胞膜部位(图 4)。

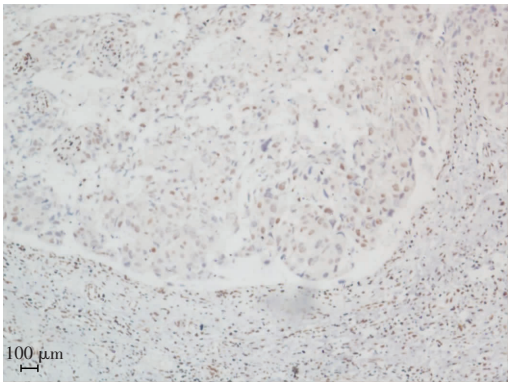


图 4　免疫组化检测 CLDN10 在膀胱癌组织的表达

2.5　Western blot 检测 CLDN10 在膀胱癌组织中的表达

提取 10 对膀胱癌组织的蛋白液后进行 Western blot 检测,结果显示,CLDN10 蛋白在膀胱癌组织中的表达升高,而在癌旁组织中表达相对较低($P<0.05$,图 5)。

2.6　CLDN10 促进膀胱癌细胞的生长和增殖

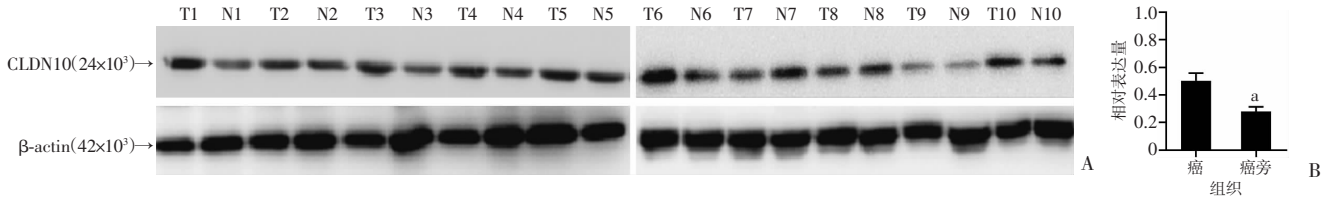
为探讨 CLDN10 在膀胱癌细胞生长和增殖中的作用情况,首先用慢病毒转染的方法构建稳定低表达 CLDN10 的膀胱癌 T24 细胞株(图 6A)。然后用 CCK-8 试剂检测膀胱癌细胞的生长能力,平板克隆实验检测膀胱癌细胞的增殖能力。结果表明,与对照组相比,敲低 CLDN10 组膀胱癌细胞的生长能力明显减弱(图 6B),细胞克隆形成数目明显减少(198.0 ± 10.3 *vs* 145.0 ± 8.4,$P<0.05$,图 6C)。

2.7　TCGA 数据库中 CLDN10 与膀胱癌患者的预后分析

利用 TCGA 数据库分析 CLDN10 与膀胱癌患者的预后,结果显示 CLDN10 高表达的患者预后较差(图 7)。

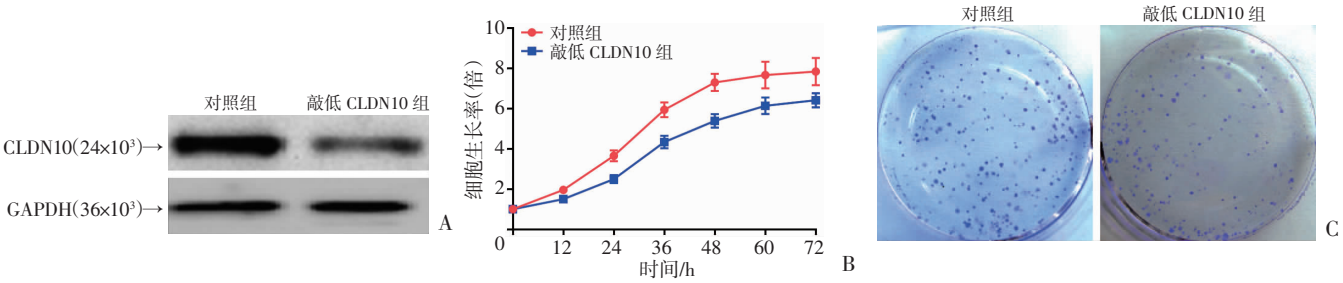
2.8　敲低 CLDN10 后膀胱癌细胞上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition,EMT)相关蛋白的表达

为检测敲低 CLDN10 对膀胱癌细胞 EMT 的影响,用 Western blot 检测膀胱癌细胞中部分 EMT 相关蛋白的表达情况。结果显示,敲低膀胱癌 T24 细胞 CLDN10 的表达后,Snail1、Vimentin、Twist 蛋白表达水平下降,而 E-cadherin 蛋白表达水平升高(图 8)。



A:Western blot 检测结果　T:膀胱癌组织;N:癌旁组织;1~10:为标本序号;B:蛋白半定量分析　a:$P<0.05$,与癌组织比较

图 5　Western blot 检测 CLDN10 在膀胱癌和癌旁组织中的表达



A:Western blot 验证稳定敲低 CLDN10 的膀胱癌 T24 细胞株;B:CCK-8 检测膀胱癌细胞的生长曲线;C:平板克隆实验检测膀胱癌细胞的克隆形成能力($n=3$)

图 6　检测敲低 CLDN10 表达后膀胱癌细胞的生长和增殖能力变化

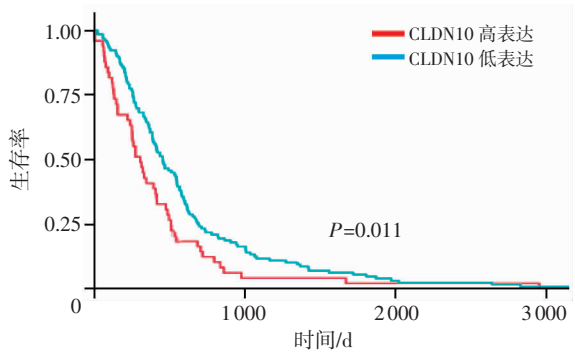
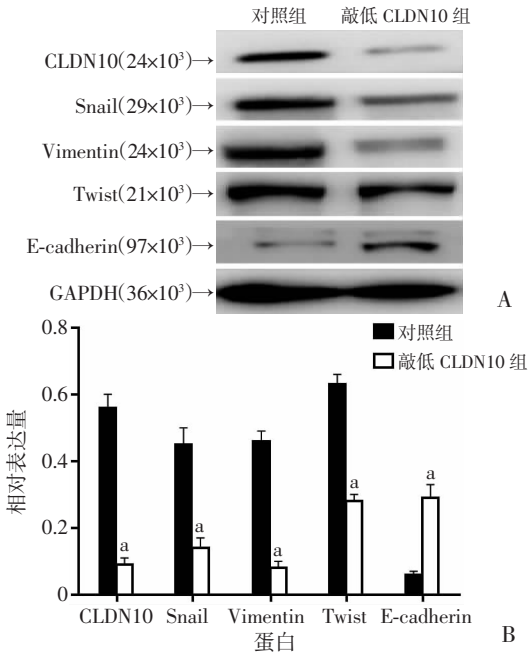


图 7 TCGA 数据库中 CLDN10 与膀胱癌患者预后的关系



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 8 Western blot 检测膀胱癌细胞内部分 EMT 指标蛋白表达水平

3 讨论

研究报道,在正常膀胱黏膜上皮和黏膜固有层组织中,有大量的 $CD4^+$、$CD8^+$T 细胞和 DC 细胞存在,而巨噬细胞只少量存在于固有层组织中[1,8-9]。但是,膀胱癌组织中免疫细胞的分布情况并不清楚。因此,我们进行了前期研究,结果表明除 CD3、CD8 外,巨噬细胞表面特征性 CD68 分子在癌组织的间质细胞中的染色呈强阳性,而 CD68 在癌旁正常组织中的表达呈阴性,提示巨噬细胞在膀胱癌组织中的浸润增多可能与膀胱癌的发生和发展有密切关系。

巨噬细胞是在组织中定植分化的单核细胞,具有吞噬活性,通常根据其分化状态和功能作用分为 M1 和 M2 亚型[9]。M1 巨噬细胞具有促炎特性(例如分泌 IL-12 和活性氧),可以识别和杀伤肿瘤细胞;M2 巨噬细胞具有抗炎特性,并分泌 IL-10,生长因子-β(TGF-β),和促血管生成因子等,可以促进肿瘤细胞的增殖和转移[10-11]。在肿瘤组织中,M1 巨噬细胞数目越多,患者预后越好;反之,M2 巨噬细胞数目多,则患者预后较差[12]。本研究采用免疫组化实验检测 M1 和 M2 型巨噬细胞表面特征性标志分子在膀胱癌组织中的表达情况,发现 M2 型巨噬细胞表面特征性分子 CD163 在癌间质细胞中的表达明显升高,提示 M2 型巨噬细胞在膀胱癌微环境中聚集增多,可能与膀胱癌的发生、发展存在密切关系。

研究报道,早期的肿瘤细胞可分泌 CCL2、IL-10、TGF-β 等募集单核细胞至上皮内并向 M2 型巨噬细胞极化,成为肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated machrophage,TAM)[2]。反过来,TAM 又可分泌 IL-10、TGF-β、EGF、Wnt 等影响肿瘤细胞内信号传导通路,引起肿瘤细胞的增殖和转移[13-16]。因此,TME 中的 TAM 可通过调控肿瘤细胞内相关的信号通路促进肿瘤的发生、发展。为筛选巨噬细胞调控的下游靶点基因,本研究通过对膀胱癌和癌旁组织的转录组测序并结合膀胱癌组织中浸润的免疫细胞评分方法,筛选出受巨噬细胞调控的下游靶点基因 CLDN10。CLDN10 蛋白分子定位于细胞膜,是 claudin 家族成员之一,而 claudin 家族构成了上皮细胞和内皮细胞间的分子屏障,是细胞间紧密连接(tight junction,TJ)的重要组成之一[17-18]。近年来的研究表明,CLDN10 的表达异常或功能失调与人体肿瘤的发生和进展有密切关系,CLDN10 的表达与甲状腺癌、卵巢癌、结直肠癌和肾癌等肿瘤患者的预后呈负相关[19-23]。在膀胱癌中,TCGA 数据库分析结果表明 CLDN10 的表达与膀胱癌患者的预后呈负相关。国内也有研究报道 CLDN10 在膀胱癌组织表达,且 CLDN10 表达失调可能与膀胱癌的发生、发展过程相关[24]。但是巨噬细胞调控 CLDN10 基因表达的具体作用机制尚不清楚。

国外研究结果表明,巨噬细胞可分泌 TNF-α,TNF-α 可促进肝癌、皮肤癌等肿瘤细胞的增殖[14,25]。SCHMITZ 等[26]研究发现 TNF-α 可以影响 TJ 蛋白的结构和功能造成小肠上皮的分子间屏障的破坏,引起小肠炎。本研究结果也表明,当敲低膀胱癌细胞中 CLDN10 的表达后,膀胱癌细胞的生长能力和细胞克隆形成能力明显下降,说明 CLDN10 具有促进膀胱癌细胞生长和增殖的能力。

膀胱癌是一种高度恶性的肿瘤,易通过淋巴结引流发生远处转移。众所周知,肿瘤细胞的细胞上皮-间质转化(EMT)使细胞失去极性和细胞间的分子屏障,导致细胞的运动能力加强,促使肿瘤细胞发生转移[27-28]。CLDN10作为上皮细胞膜上的紧密连接蛋白重要构成之一,通过使细胞之间形成紧密结合而构成了细胞间的屏障,限制了细胞的运动活性和分子物质在细胞间的滤过。那么,CLDN10在膀胱癌组织中高表达是否会促进膀胱癌细胞转移呢?有研究表明,CLDN10的表达降低或在细胞膜上的定位减少则可以引起细胞极性和运动能力的改变,从而促进肿瘤细胞的转移[28]。那么,CLDN10的高表达与膀胱癌细胞EMT是否相关呢?本研究结果表明,当敲低膀胱癌细胞CLDN10的表达后,EMT相关蛋白Snail、Vementin、Twist的表达水平下降,说明CLDN10具有促进膀胱癌细胞EMT发生的能力。

本研究对膀胱癌肿瘤微环境中巨噬细胞促进膀胱癌细胞的增殖和转移的机制进行了初步探索,通过体内外基因测序的方法联合膀胱癌微环境免疫评分的方法筛选出与巨噬细胞调控相关的CLDN10基因,并通过软件分析和查阅文献的方法对巨噬细胞调控CLDN10基因促进膀胱癌细胞增殖和转移的机制进行了初步探索,证明了CLDN10与膀胱癌的增殖和转移有关,但是这一过程是否与巨噬细胞的调控相关及其具体的作用机制仍尚不清楚,需要进一步深入地研究。从长远打算,研究巨噬细胞促进膀胱癌细胞发生、发展的分子机制,可以为免疫治疗膀胱癌提供新的理论依据和治疗策略,研究意义重大。

参考文献:

[1] KIM R, EMI M, TANABE K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape[J]. Immunology, 2007, 121(1): 1-14. DOI:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.

[2] JOSEPH M, ENTING D. Immune responses in bladder cancer-role of immune cell populations, prognostic factors and therapeutic implications[J]. Front Oncol, 2019, 9: 1270. DOI:10.3389/fonc.2019.01270.

[3] RIBATTI D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 7175-7180. DOI:10.18632/oncotarget.12739.

[4] PATSOUKIS N, WANG Q, STRAUSS L, *et al*. Revisiting the PD-1 pathway[J]. Sci Adv, 2020, 6(38): eabd2712. DOI:10.1126/sciadv.abd2712.

[5] TAYLOR G, KUMAR S, BRENCHLEY P, *et al*. Immunosurveillance in pre-malignant occupational bladder disease[J]. Int J Cancer, 1979, 23(4): 487-493. DOI:10.1002/ijc.2910230408.

[6] CATALONA W J. Commentary on the immunobiology of bladder cancer[J]. J Urol, 1977, 118(1 Pt 1): 2-6. DOI:10.1016/s0022-5347(17)57865-9.

[7] CHEN W Q, ZHENG R, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[8] XUE Y Y, GAO S, GOU J X, *et al*. Platinum-based chemotherapy in combination with PD-1/PD-L1 inhibitors: preclinical and clinical studies and mechanism of action[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2021, 18(2): 187-203. DOI:10.1080/17425247.2021.1825376.

[9] ARAS S, ZAIDI M R. TAMeless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis[J]. Br J Cancer, 2017, 117(11): 1583-1591. DOI:10.1038/bjc.2017.356.

[10] MARTINEZ F O, HELMING L, GORDON S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 451-483. DOI:10.1146/annurev.immunol.021908.132532.

[11] MOSSER D M, EDWARDS J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(12): 958-969. DOI:10.1038/nri2448.

[12] MEI J, XIAO Z, GUO C, *et al*. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: a systemic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2016, 7(23): 34217-34228. DOI:10.18632/oncotarget.9079.

[13] CASSETTA L, POLLARD J W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(12): 887-904. DOI:10.1038/nrd.2018.169.

[14] MOORE R J, OWENS D M, STAMP G, *et al*. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 828-831. DOI:10.1038/10552.

[15] CANLI Ö, NICOLAS A M, GUPTA J, *et al*. Myeloid cell-derived reactive oxygen species induce epithelial mutagenesis[J]. Cancer Cell, 2017, 32(6): 869-883.e5. DOI:10.1016/j.ccell.2017.11.004.

[16] BRUNI D, ANGELL H K, GALON J. The immune contexture and immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(11): 662-680. DOI:10.1038/s41568-020-0285-7.

[17] HIROHASHI S, KANAI Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis[J]. Cancer Sci, 2003, 94(7): 575-581. DOI:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01485.x.

[18] TSUKITA S, FURUSE M, ITOH M. Multifunctional strands in tight junctions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(4): 285-293. DOI:10.1038/35067088.

[19] HUANG G W, DING X, CHEN S L, *et al*. Expression of claudin 10 protein in hepatocellular carcinoma: impact on survival[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(8): 1213-1218. DOI:10.1007/s00432-011-0987-z.

[20] ZHOU Y, XIANG J, BHANDARI A, *et al*. CLDN10 is associated with papillary thyroid cancer progression[J]. J Cancer, 2018, 9(24): 4712-4717. DOI: 10.7150/jca.28636.

[21] YANG W P, LI L, ZHANG K N, *et al*. CLDN10 associated with immune infiltration is a novel prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma[J]. Epigenomics, 2021, 13(1): 31-45. DOI:10.2217/epi-2020-0256.

[22] 裴海平, 蒋锐, 葛华, 等. Claudin-5 和 claudin-10 在结直肠癌中的表达及其意义[J]. 中华普通外科杂志, 2010, 25(1):40-43.
PEI H P, JIANG R, GE H, *et al*. Claudin-5 and claudin-10 expression in colorectal carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2010,25(1):40-43.

[23] 左剑辉, 于在诚, 刘芝华, 等. Claudin-10 蛋白在食管癌中的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(5): 577-580.
ZUO J H, YU Z C, LIU Z H, *et al*. Functional studies of Claudin-10 in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Acta Univ Med Anhui, 2009, 44(5): 577-580.

[24] 文晓刚. Claudin-2 和 claudin-10 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义[D]. 衡阳: 南华大学, 2013.
WEN X G. Expression of claudin-2 and claudin-10 in bladder urothelial carcinoma and its significance [D]. Hengyang: University of South China, 2013.

[25] CHEN Y X, WEN H H, ZHOU C, *et al*. TNF-α derived from M2 tumor-associated macrophages promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness through the Wnt/β-catenin pathway in SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells[J]. Exp Cell Res, 2019, 378(1): 41-50. DOI:10.1016/j.yexcr.2019.03.005.

[26] SCHMITZ H, FROMM M, BENTZEL C J, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6[J]. J Cell Sci, 1999, 112 (Pt 1): 137-146.

[27] LI Z J, XUAN W T, HUANG L S, *et al*. Claudin 10 Acts as a novel biomarker for the prognosis of patients with ovarian cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 20(1): 373-381. DOI:10.3892/ol.2020.11557.

[28] BHAT A A, UPPADA S, ACHKAR I W, *et al*. Tight junction proteins and signaling pathways in cancer and inflammation: a functional crosstalk [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1942. DOI:10.3389/fphys.2018.01942.

(**收稿**:2021-06-20;**修回**:2021-09-27)

(编辑 汪勤俭)